

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets<sup>4</sup> :</b> <b>A61K 39/29, G01N 33/576</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 88/ 03410</b> <b>(43) Date de publication internationale: 19 mai 1988 (19.05.88)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR87/00441</b> <b>(22) Date de dépôt international: 6 novembre 1987 (06.11.87)</b>  <b>(31) Numéros des demandes prioritaires: 86/15625 87/01738</b>  <b>(32) Dates de priorité: 7 novembre 1986 (07.11.86) 11 février 1987 (11.02.87)</b>  <b>(33) Pays de priorité: FR</b>  <b>(71)(72) Déposant et inventeur: INSTITUT PASTEUR [FR/ FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).</b>  <b>(72) Inventeur: PILLOT, Jacques ; 14, chemin de Moulon, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR).</b>		<b>(74) Mandataires: ORES, Bernard etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</b>  <b>(81) Etats désignés: AU, DK, JP.</b>  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifica- tions sont reçues.</i>
<b>(54) Title: VIRAL AGENT FOR NANB HEPATITIS, ANTIGEN AND IMMUNOLOGIC REAGENT</b> <b>(54) Titre: AGENT VIRAL DE L'HEPATITE NANB, ANTIGENE ET REACTIF IMMUNOLOGIQUE</b>  <b>(57) Abstract</b> <p>New purified viral agent involved in viral non-A non-B, epidemic, sporadic or post-transfusional hepatitis, defined by the distribution profile of its antigenic activity, comprising at least one band at a density of 1.28-1.32 g/cm<sup>3</sup> and/or at least one band with a density of 1.17-1.19 g/cm<sup>3</sup>, and the antigen associated with said viral agent. Method for isolating said viral agent and the antigen which is associated therewith. Utilization of said viral agent as diagnostic reagent. Method for the detection of the non-A non-B antigen present in the faeces of patients suffering from non-A non-B viral hepatitis. Immunologic reagent for the detection of NANB viral, epidemic, sporadic or post-transfusional hepatitis and method for isolating anti-NANB antibodies capable of being used as immunologic reagents. Applications of said anti-NANB antibodies to the diagnosis of viral, epidemic, sporadic or post-transfusional NANB hepatitis and as therapeutic agents.</p> <b>(57) Abrégé</b> <b>Nouvel agent viral purifié impliqué dans l'hépatite virale non-A non-B, épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, défini par le profil de répartition de son activité antigénique, qui comporte au moins une bande à une densité de 1,28-1,32 g/cm<sup>3</sup> et/ou au moins une bande à une densité de 1,17-1,19 g/cm<sup>3</sup>, et l'antigène associé à cet agent viral. Procédé d'isolement dudit agent viral et de l'antigène qui lui est associé. Utilisation dudit agent viral en tant que réactif de diagnostic. Procédé de détection d'antigène non-A non-B présent dans les fèces de patients atteints d'hépatite virale non-A non-B. Réactif immunologique pour la détection de l'hépatite virale NANB, épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle et procédé d'isolement d'anticorps anti-NANB aptes à être utilisés en tant que réactifs immunologiques. Applications desdits anticorps anti-NANB au diagnostic de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle et en tant qu'agents thérapeutiques.</b>		

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

- 1 -

Agent viral de l'hépatite NANB, antigène et réactif immunologique.

5

La présente invention est relative à l'isolement et à la caractérisation d'un agent viral impliqué dans l'hépatite non-A non-B tant épidémique que sporadique ou que post-  
10 transfusionnelle.

L'hépatite virale peut être causée par le virus de l'hépatite A (HAV), par le virus de l'hépatite B (HBV) et par un nombre inconnu de virus d'hépatite non-A non-B (NANB) non encore identifiés. Actuellement dans les pays développés dans  
15 lesquels la prophylaxie de l'HBV est efficace, les NANB sont la cause la plus importante d'hépatite infectieuse conduisant à l'hospitalisation. Cette maladie est considérée comme im-

- 2 -

pliquant au moins trois virus : deux sont transmis par le sang contaminé et les produits de sang contaminé; pour le troisième qui est à l'origine de l'hépatite NANB épidémique, l'Inventeur a pu établir qu'il est également responsable de  
5 50 à 60% des cas d'hépatites nécessitant une hospitalisation, rapportés dans les pays occidentaux et son mode de transmission est inconnu. Dans les pays en voie de développement, le NANB semble également associé à des épidémies à grande échelle liées à un mode de transmission fécal-oral véhiculé  
10 par l'eau. Actuellement cinq cas d'épidémies de ce type ont été rapportés depuis 1980 : en Inde, en Sibérie, au Népal, en Algérie et récemment en Côte d'Ivoire. Dans tous ces cas, un taux de mortalité élevé a été observé parmi les femmes enceintes.

15 Nos connaissances actuelles concernant les virus qui sont à l'origine de l'hépatite NANB sont d'une imprécision décourageante et sont limitées à des données cliniques et épidémiologiques. Des agents filtrables ont nettement été isolés par inoculation de sang ou de produits  
20 sanguins provenant de sujets souffrant d'hépatite NANB post-transfusionnelle à des chimpanzés et des produits sanguins infectieux sont disponibles. En ce qui concerne l'hépatite NANB épidémique, très peu d'infections expérimentales ont été réalisées : l'infection s'est avérée  
25 transmissible aux ouistitis (*Saguinus mystax*), aux singes macaques (*Macacus cynomolgus*) et à un volontaire humain et récemment à des singes verts africains (*Cercopithecus aethops* et *Erythrocebus patas*), mais aucune préparation infectieuse définie n'a été proposée.

30 En ce qui concerne l'hépatite post-transfusionnelle, en dépit de la pléthore de rapports sur des systèmes antigène-anticorps NANB, des modifications ultrastructurales et des particules analogues à des virus, tous potentiellement prometteurs, aucun agent causal ni aucun système ou virus qui  
35 remplisse les critères sérologiques acceptés pour une association causale spécifique, n'a été identifié antérieure-

- 3 -

ment aux travaux qui ont abouti à la présente invention. En ce qui concerne l'hépatite épidémique, des particules analogues à des virus, de forme sphérique et de 27 nm de diamètre ont été visualisées dans de très rares fèces et la caractérisation immunologique a été médiocrement réalisée par agglutination au microscope électronique. La réplication virale n'a jamais été obtenue dans des cultures cellulaires pour quelque virus NANB que ce soit.

La Demande de Brevet français n° 86 05437, au nom de l'INSTITUT PASTEUR, et qui mentionne Monsieur PILLOT comme Inventeur, a pour objet un réactif propre à permettre la détection d'hépatites virales NANB épidémiques et un procédé de diagnostic mettant en oeuvre ce réactif; le réactif conforme à cette Demande de Brevet est constitué par des IgM anti-NANB isolées de sérums de singes infectés artificiellement par des extraits de fèces de patients connus pour être atteints d'hépatite NANB épidémique, lesquelles IgM anti-NANB sont avantageusement fixées sur des supports solides tels que, notamment, des plaques de PVC.

La poursuite de ses recherches à partir de l'invention objet de la Demande de Brevet précitée a permis à l'Inventeur d'atteindre les buts suivants :

- 1°) Il a infecté des singes dont il a utilisé les anticorps (Ac), ainsi que les Ac de convalescents humains, pour développer un test ELISA pour la détection spécifique d'antigènes (Ag) associés au virus et la détection des Ac anti-viraux;
- 2°) L'Inventeur a réussi à répliquer le virus dans une lignée continue de cellules hépatocytaires avec une bonne production de matériel antigénique;
- 3°) Il est parvenu à visualiser des particules virales dans des préparations purifiées d'échantillons de fèces et dans des lignées d'hépatocytes infectées;
- 4°) Il a pu établir l'implication du même agent causal dans l'hépatite virale NANB aussi bien épidémique que sporadique.

- 4 -

5°) En considérant le rôle de l'agent NANB épidémique dans l'hépatite sporadique, l'Inventeur a été en mesure de vérifier que ledit agent peut être non seulement véhiculé par l'eau, mais être également transmis par d'autres  
5 voies que l'eau et notamment par la voie sanguine transfusionnelle.

La présente invention s'est donné pour but l'identification et la caractérisation d'un nouvel agent viral, ainsi que d'un antigène (Ag) NANB associé à ce nouvel agent  
10 viral et une méthode de diagnostic d'hépatite NANB aussi bien épidémique que sporadique et que post-transfusionnelle, par détection de l'Ag associé au virus de NANB, en utilisant les anticorps (Ac) qui font l'objet de la Demande de Brevet INSTITUT PASTEUR précitée ou par recherche des Ac du malade,  
15 en utilisant le virus ou ses fractions adsorbé sur un support adéquat.

La présente invention a également pour but de pourvoir à des réactifs de diagnostic immunologiques utilisables dans la méthode de diagnostic de l'hépatite NANB conforme à  
20 la présente invention, ainsi qu'à un kit prêt à l'emploi pour la réalisation de ladite méthode de diagnostic.

La présente invention a pour objet un nouvel agent viral purifié impliqué dans l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce  
25 qu'il présente un profil de répartition de son activité antigénique qui comporte au moins une bande à une densité de 1,28-1,32 g/cm<sup>3</sup> et/ou au moins une bande à une densité de 1,12-1,19 g/cm<sup>3</sup>.

Selon un mode de réalisation de l'agent viral purifié impliqué dans l'hépatite NANB épidémique, sporadique ou  
30 post-transfusionnelle, celui-ci est isolé de fèces de patients atteints d'hépatite NANB, par centrifugation et filtration à travers un filtre dont la porosité est de l'ordre de 0,22 µm.

35 Selon un autre mode de réalisation de l'agent viral impliqué dans l'hépatite NANB épidémique, sporadique ou post-

- 5 -

transfusionnelle, celui-ci est obtenu à partir d'hépatocytes ou de lignées cellulaires continues d'hépatocytes, inoculés par de l'extrait de fèces d'un malade atteint d'hépatite NANB ou par un extrait de foie d'un singe infecté.

5           Selon encore un autre mode de réalisation de l'agent viral impliqué dans l'hépatite NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, ledit agent viral auquel est associé l'antigène spécifique, se présente sous la forme de particules virales sphériques de deux type principaux, à savoir des particules d'environ 75 nm de diamètre et des particules de l'ordre de 25 à 30 nm de diamètre, les premières étant majoritairement présentes dans les fractions d'un gradient de CsCl de densité variant entre 1,1 et 1,6 g/ml, dont la densité est comprise entre 1,28 et 1,32 g/cm<sup>3</sup> et les fractions à 40-41,5% d'un gradient de saccharose de concentrations variant de 10 à 60% poids/volume et les secondes étant majoritairement présentes dans les fractions du gradient de CsCl de densité comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup> et les fractions à 26-28% dudit gradient de saccharose.

20           La présente invention a également pour objet un antigène associé au virus NANB défini plus haut, caractérisé en ce qu'il est obtenu par traitement d'un agent viral isolé de fèces de patients, cultivé sur des hépatocytes infectés par le virus de l'hépatite NANB, par des agents de dissociation physiques ou chimiques.

25           Selon un mode de réalisation avantageux de l'antigène associé au virus NANB, susdit, ledit antigène est obtenu par traitement aux ultra-sons d'un agent viral isolé de lignées cellulaires continues d'hépatocytes infectés par le virus de l'hépatite NANB.

30           Selon un autre mode de réalisation de l'antigène associé au virus NANB, son profil de répartition dans un gradient de CsCl se présente sous la forme d'une bande à une densité de 1,12-1,19 g/cm<sup>3</sup> et/ou d'une bande de densité 1,28-1,32 et l'antigène est présent après ultra-centrifugation des fractions de CsCl dans un gradient de saccharose,



- 6 -

dans la fraction à 26-28% du gradient de saccharose pour la première bande et dans la fraction à 40-41,5% du gradient de saccharose pour la seconde bande.

La présente invention a, de plus, pour objet un  
5 procédé d'isolement d'un agent viral impliqué dans l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, qui est caractérisé en ce que des fèces de patients atteints d'hépatite NANB sont soumises à un traitement de centrifuga-  
10 tion, suivi d'un traitement de filtration à travers un élément filtrant dont la porosité est de l'ordre de 0,22  $\mu$ m, pour extraire ledit agent viral des fèces.

Selon un mode de mise en oeuvre du procédé d'isolement de l'agent viral susdit, le traitement de centrifugation est avantageusement constitué par une opération de cen-  
15 trifugation à 5000 - 8000 g environ pendant 10 minutes environ.

Selon un autre mode de mise en oeuvre du procédé d'isolement de l'agent viral susdit, préalablement aux opérations de centrifugation et de filtration susdites, l'extrait  
20 de fèces est soumis à un traitement par ultra-sons ou à un traitement de dissociation chimique.

La présente invention a également pour objet un autre procédé d'obtention de l'agent viral susdit, qui est caractérisé en ce que des hépatocytes ou des lignées cellu-  
25 laires continues d'hépatocytes sont inoculés par un extrait de fèces d'un patient atteint d'hépatite NANB ou par un extrait de foie d'un singe (de préférence Saimiri) inoculé par un extrait de fèces de patients souffrant d'hépatite NANB, et cultivés jusqu'à confluence de la culture, à partir  
30 de laquelle est réalisée une sous-culture, qui est centrifugée après plusieurs passages, pour recueillir l'agent viral recherché.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de ce procédé, le culot de centrifugation est repris par un tampon  
35 approprié pour être soumis à un traitement par ultra-sons qui



- 7 -

libère dans le surnageant, l'Ag NANB.

La présente invention a en outre pour objet un procédé de détection d'antigène NANB présent dans les fèces de patients atteints d'hépatite virale NANB épidémique, 5 spora-dique ou post-tranfusionnelle, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre des immunoglobulines isolées de sérum de patients convalescents, ou de singes préalablement infectés par le virus de l'hépatite NANB, qui sont incubées avec des extraits de fèces de mammifères présumés atteints d'hépatite 10 virale NANB, pour former un immuncomplexe antigène-anticorps qui est révélé à l'aide d'un test de détection approprié de la présence de l'antigène NANB dans lesdites fèces, tel qu'un test ELISA ou un test radioimmunologique, notamment.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du pro- 15 cédé de détection d'antigène NANB dans les fèces de patients atteints d'hépatite NANB, celui-ci est caractérisé en ce que des extraits de fèces de mammifères présumés infectés par le virus NANB, obtenus par centrifugation et filtration des fèces de ces mammifères, sont incubés avec une fraction d'IgM 20 anti-NANB isolée de sérums de patients, ou de singes infectés artificiellement par des extraits de fèces de patients humains connus pour être atteints d'hépatite NANB, laquelle fraction est fixée sur un support solide, puis avec une fraction d'IgG immune anti-virus NANB purifié selon l'invention, 25 d'un mammifère, de la même espèce ou d'une espèce voisine, marquée avec un marqueur enzymatique tel que la  $\beta$ -galactosidase ou la peroxydase, la réaction étant développée à l'aide d'un substrat révélateur approprié tel que l'orthonitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside ou l'orthophénylène-diamine, 30 en tampon acide. Le marquage peut être fait également avec un élément fluorescent ou radioactif selon les méthodes connues de l'homme de l'Art.

Conformément à l'invention, des souches de l'agent viral conforme à l'invention, isolées comme décrit dans ce 35 qui précède et ci-après, et caractérisées comme indiqué plus loin, ont été déposées auprès de la COLLECTION NATIONALE DE

- 8 -

CULTURE DE MICROORGANISMES tenue par l'INSTITUT PASTEUR, en date du 30 Octobre 1986, à savoir :

- 5                   - une souche d'agent viral isolé de fèces d'un malade atteint d'hépatite NANB sporadique, dite "Souche Clamart", qui a été affectée du Numéro dedépôt : I-617,
- 10                  - une souche d'un agent viral isolé de fèces d'un malade atteint d'hépatite NANB épidémique, dite "Souche ivoirienne", qui a été affectée du Numéro de dépôt : I-616.

15                  Selon un mode de mise en oeuvre du procédé de détection des anticorps présents dans le sang du malade ou du convalescent ou dans des produits utilisés en transfusion sanguine ou dans des fractions dérivées de sang, ayant été en contact avec le virus agent causal de l'hépatite non A non B, tel que défini selon la présente invention, dont les souches I-617 et I-616 et celles présentant une réaction immunologique croisée avec les deux souches de référence, le sérum du malade ou du patient convalescent est mis en contact  
20 avec la préparation virale purifiée (ou avec une fraction de celle-ci) telle que recueillie dans les conditions mentionnées ci-dessus, après centrifugation et isolement de la bande correspondant à une densité de 1,30.

25                  Ladite préparation virale est fixée, par exemple, sur les parois d'une microplaque selon les techniques connues.

                  Le complexe Ag/Ac est révélé par une préparation d'anti-immunoglobulines humaines marquées par un marqueur adéquat, par exemple une enzyme.

30                  Un système analogue peut être utilisé pour caractériser une activité anticorps dans les IgM d'un patient en vue d'un diagnostic sérologique très précoce de la maladie, en utilisant des anti-IgM humaines, ou mieux en captant les IgM d'un sérum en les faisant réagir avec le virus ou ses frac-  
35 tions et en caractérisant l'Ag fixé sur l'IgM du malade.

- 9 -

La présente invention a, de plus, pour objet des réactifs immunologiques pour la détection de l'hépatite NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, qui sont caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des immunoglobulines isolées du sérum de convalescents humains ou de sérum de singes préalablement infectés par le virus de l'hépatite NANB, lesquels réactifs sont aptes à former un immunocomplexe antigène-anticorps lorsqu'ils sont incubés avec des extraits de fèces contenant des antigènes d'hépatite NANB.

5  
10 Selon un mode de réalisation avantageux des réactifs immunologiques conformes à la présente invention, ceux-ci sont aptes à former un immunocomplexe par incubation avec des extraits de fèces d'individus contaminés par du virus NANB selon l'invention et purifiés par centrifugation et filtration.

La présente invention a également pour objet un réactif immunologique pour la détection de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il est constitué par un anticorps anti-hépatite NANB préparé à partir de sérums d'animaux artificiellement infectés par ingestion d'extraits de fèces de patients atteints d'hépatite virale NANB, ou de sérums d'animaux immunisés par le virus NANB ou ses fractions purifiées.

20 Selon un mode de réalisation avantageux de ce réactif immunologique, l'anticorps anti-hépatite NANB (IgM ou IgG) est fixé sur un support solide.

Selon une modalité avantageuse de ce mode de réalisation, le support solide revêtu d'anticorps anti-hépatite NANB est en outre recouvert d'une protéine, telle que BSA en particulier, de préférence en solution tamponnée.

30 Le réactif immunologique conforme à la présente invention est mis en oeuvre dans le procédé de détection d'antigène NANB conforme à l'invention en l'incubant avec des extraits de fèces ou des produits sanguins ou du sérum de patients, puis avec des fractions d'anticorps purifiés à partir de sérums de patients convalescents d'hépatite NANB épi-

- 10 -

démique, ou de sérums d'animaux infectés artificiellement, immunisés contre ce virus, lesdits anticorps étant marqués par une enzyme convenable telle que la  $\beta$ -galactosidase, par exemple. La réaction est développée à l'aide d'un substrat  
5 révélateur approprié tel que l'orthonitrophényl- $\beta$ -galactopyranoside.

Le procédé de diagnostic in vitro de la présence du virus de l'hépatite NANB conforme à la présente invention consiste donc à mettre en contact un sérum ou un autre milieu  
10 biologique d'un patient dont on cherche à établir le diagnostic, avec au moins une des protéines ou des glycoprotéines du virus NANB ou avec un lysat viral ou avec un extrait viral, puis à détecter la réaction immunologique par la méthode ELISA ou par une autre méthode immunoenzymatique ou une mé-  
15 thode par immunofluorescence, qui peut mesurer directement ou indirectement l'immunofluorescence ou la réaction immunoenzymatique.

C'est la raison pour laquelle la présente invention englobe également les extraits viraux marqués, qu'ils soient  
20 marqués par une enzyme, par fluorescence ou qu'ils soient marqués par une radioisotope.

Les méthodes d'immunodétection comprennent, comme on le sait :

- le dépôt de quantités d'extrait spécifique ou des  
25 protéines virales conformes à l'invention, dans ou sur un support tel que les puits d'une microplaque de titration ;

- l'introduction de dilutions croissantes du sérum à diagnostiquer sur ledit support, tel que lesdits puits ;

- l'incubation du support tel que la microplaque  
30 susdite ;

- le lavage soigneux du support tel que la microplaque susdite à l'aide d'un tampon convenable ;

- l'introduction d'anticorps anti-immunoglobuline humaine marqués spécifiques dans ou sur le support tel que  
35 les puits de la microplaque susdite, le marquage étant réalisé par une enzyme choisie parmi celles capables d'hydrolyser

- 11 -

un substrat de telle manière que l'absorption de radiations par ce dernier soit modifiée au moins dans une bande spécifique de longueurs d'ondes, et

5                   - la détection, de préférence de manière comparative, par rapport à un témoin, de la quantité de substrat hydrolysé, à la fois par la mesure du produit biologique dangereux et par la présence effective de la maladie.

La présente invention a également pour objet un kit  
10 - ou ensemble - prêt à l'emploi pour la réalisation du procédé de diagnostic (recherche de l'anticorps ou du virus NANB) conforme à l'invention, défini plus haut, lequel kit est caractérisé en ce qu'il comprend :

15                   - un extrait ou une fraction purifiée de l'agent viral conforme à l'invention, lequel extrait ou fraction est marqué, par exemple par un radioisotope, une enzyme ou par immunofluorescence ;

20                   - des anti-immunoglobulines humaines ou une protéine A éventuellement fixées sur un support insoluble dans l'eau tel que sphères d'agarose ou de latex, magnétiques ou non ;

                  - des tampons et, si nécessaire, des substrats pour visualiser les marquages.

La caractérisation de certains des antigènes qui  
25 entrent dans la composition de l'agent viral isolé conformément à la présente invention a été réalisée dans un premier temps sur la souche Clamart, en procédant comme décrit ci-après.

La souche Clamart a été isolée à partir de selles  
30 d'un patient atteint d'hépatite NANB sporadique.

Le surnageant desdites selles a été centrifugé en gradient de chlorure de césium dont la bande contenant l'antigène viral purifié comme défini plus haut a été recueillie et sa densité déterminée comme étant de 1,30.

35                   Les épitopes reconnus dans le test de diagnostic

- 12 -

défini plus haut, sont portés par ces antigènes, qui peuvent à ce titre, être utilisés dans ledit test.

Le réactif apte à être utilisé pour la détection d'hépatite NANB conforme à la présente invention, est préparé et utilisé comme décrit ci-après :

Des singes sont artificiellement infectés par ingestion de fèces de patients atteints d'hépatite NANB épidémique.

Les sérums de singes utilisés sont ceux collectés le 27ème jour après l'infection, à partir des singes infectés artificiellement comme indiqué plus haut. Ces sérums sont chromatographiés sur une colonne de gel de dextrane dans un tampon Tris-NaCl 0,1M, pH 8 pour isoler les anticorps recherchés qui sont des IgM anti-NANB.

Les IgM ainsi isolées sont fixées sur des supports solides, tels que de préférence des plaques de PVC, en mettant les IgM à des concentrations d'environ 10 à 50 µg de protéines par ml de PBS, en contact avec les supports solides pendant 18 à 24 heures à + 4°C. Il est préféré que ces plaques de PVC revêtues des IgM anti-hépatite NANB, soient ensuite recouvertes d'une couche de PBS contenant 1 % de BSA (sérumalbumine bovine) et 0,1 % de "Tween 20". Les plaques de PVC doublement revêtues sont alors prêtes à l'usage en tant que réactif de diagnostic utile pour la détection de l'agent viral associé à l'hépatite NANB.

Le procédé de diagnostic conforme à la présente invention commence de préférence par l'incubation desdites plaques de diagnostic avec des extraits de fèces à diagnostiquer, pendant 1 heure à 37°C. Les plaques sont ensuite incubées avec des fractions d'IgG obtenues par purification de sérums de patients convalescents d'hépatite NANB épidémique, par chromatographie sur une colonne de DEAE-Trisacryl et marquées par une enzyme, de préférence la bêta-galactosidase, d'hydrolyse d'un substrat révélateur en présence duquel a lieu la réaction, et qui est de préférence l'orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside.



- 13 -

La méthode de détection conforme à l'invention peut également consister à rechercher la présence d'anticorps NANB dans le sérum ou autre milieu biologique d'un malade ou d'un convalescent ; en pareil cas, le sérum est mis en contact avec la préparation virale conforme à l'invention - collectée par exemple après centrifugation et isolement de la bande de densité à 1,28-1,32 g/cm<sup>3</sup> correspondante -, ou avec une fraction de cette préparation virale ; cette préparation virale, ou l'une de ses fractions, est mise en réaction avec une préparation d'IgM ou d'IgG qui revêt les parois d'une microplaque d'une manière connue de l'Homme de l'Art. La formation d'un immunocomplexe (virus ou fraction de celui-ci - anticorps humains anti-virus) s'oppose alors à la révélation de l'antigène qu'il contient par l'IgG de convalescent marquée par exemple par une enzyme.

La recherche d'anticorps à l'aide de cette méthode de détection peut être effectuée dans le sang de malades ou de convalescents, dans les produits utilisés dans les transfusions sanguines et dans les fractions dérivées du sang de personnes ayant été exposées à l'agent causal de l'hépatite NANB tel que défini plus haut, parmi lesquelles les souches I-617 et I-616 et celles présentant une réaction immunologique croisée avec ces deux souches de référence, notamment la souche isolée de patients atteints d'hépatite NANB post-transfusionnelle, dont les propriétés immunologiques sont identiques à celles de la souche I-617, et qui est identifiée comme souche virale "H-SET" déposée le 5 Février 1987 sous le N° 87.02.05.02 auprès de la Collection ECACC (Grande-Bretagne).

Bien que les données cliniques et épidémiologiques aient pu suggérer que la forme épidémique de l'hépatite NANB présentée par des patients atteints d'hépatite NANB épidémique est due à un virus différent de celui qui est à l'origine de l'hépatite NANB post-transfusionnelle transmise par injection parentérale, conformément à la présente invention l'Inventeur a pu isoler de patients atteints d'hépatite NANB post-transfusionnelle une nouvelle souche de virus NANB dont



- 14 -

les propriétés immunologiques sont pratiquement identiques à celles des souches déposées le 30 Octobre 1986 sous les N° I-616 et I-617 auprès de la CNCM de l'Institut Pasteur. Des tests sérologiques très sensibles de présence de virus HAV et  
5 HBV ont permis d'exclure ces deux virus en tant qu'agents étiologiques et d'exclure, de même, d'autre virus hépatotropes tels que le cytomégalovirus, le virus d'Epstein-Barr et le virus de la fièvre jaune.

La présente invention a en outre pour objet un nou-  
10 vel agent viral purifié impliqué dans les formes sporadique, épidémique et post-transfusionnelle de l'hépatite NANB. Ce virus se distingue des virus HAV et HBV en ce qui concerne l'homologie antigénique de ses protéines en tant que matériel génétique.

15 Les compositions préparées conformément à la présente invention (antigènes viraux purifiés, protéines recombinantes obtenues par l'expression du virus NANB dans des cellules procaryotes ou eucaryotes ou peptides synthétiques déduits de la séquence du génome) peuvent être utilisées pour  
20 le diagnostic de l'hépatite NANB ou pour la vaccination propre à induire la synthèse d'une réponse immune protectrice après administration à l'hôte.

La présente invention englobe toutes les compositions de ce type contenant un antigène présentant des pro-  
25 priétés immunologiques équivalentes à celles du virus NANB Clamart (CNCM I-617) ou Côte d'Ivoire (CNCM I-616). En effet, deux protéines ou antigènes sont considérés comme équivalents dans le cadre de la présente invention lorsqu'ils sont capables d'être reconnus par les mêmes anticorps. Les produits  
30 exprimés par des séquences correspondantes du matériel génétique codant des séquences génétiques correspondantes sont, par suite, compris dans le cadre de tels antigènes équivalents.

La présente invention englobe également les sérums  
35 pouvant être produits à partir d'animaux par inoculation à ces derniers de virus NANB à l'aide des compositions préci-

- 15 -

tées. En particulier, la présente invention englobe les anticorps polyclonaux spécifiquement dirigés contre chacun des antigènes du virus NANB. Elle englobe également les anticorps monoclonaux susceptibles d'être obtenus par des méthodes appropriées et dirigées plus spécifiquement contre les antigènes du virus NANB.

Conformément à la présente invention, l'utilisation du virus ou de son lysat ou d'une fraction de ce lysat peut être envisagée pour la préparation d'anticorps monoclonaux et le lysat viral ou les fraction de celui-ci ou les protéines purifiées à partir de ce virus, du lysat ou de ses fractions, peuvent être utilisés pour la recherche d'anticorps dans le sérum des patients par mise en oeuvre de tests classiques de type RIPA, ELISA ou Western blot (immunoempreinte).

Ces anticorps polyclonaux et monoclonaux peuvent être utilisés dans un grand nombre d'applications au nombre desquelles on peut citer la neutralisation de l'antigène correspondant ou du virus total. Ils peuvent être utilisés pour détecter des antigènes viraux dans des préparations biologiques ou pour purifier des antigènes correspondants.

La présente invention englobe également tout virus de l'hépatite NANB équivalent présentant les mêmes caractéristiques immunologiques. Les travaux menés par l'Inventeur ont montré la relation immunologique entre les matériels antigéniques isolés d'extraits de fèces de malades atteints respectivement d'hépatite NANB épidémique, sporadique et post-transfusionnelle.

C'est ainsi que la souche de type Clamart (déposée sous le N° I-617 auprès de la CNCM et également déposée auprès de la Collection ECACC sous le N° 87.02.05.02) a été isolée à partir des selles d'une malade qui présentait une hépatite aiguë NANB dûment caractérisée comme hépatite NANB transfusionnelle. Les selles contenaient l'antigène conforme à l'invention, également caractérisé, conformément à l'invention, dans les hépatites épidémiques (Côte d'Ivoire) et sporadiques (France).

- 16 -

Un antigène associé au virus de l'hépatite NANB a été caractérisé pendant 15 jours à la phase aiguë de la maladie. D'autres cas similaires ont été observés avec caractérisation du même antigène dans les selles et isolement  
5 d'un virus présentant les caractéristiques immunologiques identiques aux virus I-616 et I-617.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

10 L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces  
15 exemples de mise en oeuvre sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Au cours d'une première étape, deux singes *Cercopithecus aethops* et un singe *Erythrocebus patas* ont été  
20 inoculés par voie orale par 2 ml d'un mélange d'un extrait aqueux à 10% de fèces de patients ivoiriens présumés atteints d'hépatite NANB épidémique, collectées au cours des premiers jours ayant suivi l'apparition des symptômes. Le mélange avait été préalablement centrifugé et filtré à travers des  
25 filtres Millipore de 0,22 µm pour éliminer les bactéries et les parasites. Les échantillons de sérum et les échantillons de fèces de ces singes ont été collectés d'une part avant l'administration de l'extrait de fèces et d'autre part le vingt-septième jour après l'inoculation. Les fonctions hépa-  
30 tiques de ces singes n'ont pas été étudiées; ces animaux ne présentaient pas de manifestations cliniques évidentes. Un singe *Saimiri* a également été inoculé dans les mêmes conditions par 0,5 ml d'un extrait de fèces provenant d'un patient ivoirien différent de ceux utilisés pour les singes verts  
35 d'Afrique. Un second singe *Saimiri* qui avait été inoculé trois mois auparavant par une préparation fécale de virus

- 17 -

d'hépatite A et séroconverti à l'aide d'anticorps IgM anti-HAV au jour 29, a été inoculé par voie intraveineuse par 0,5 ml du même échantillon de fèces filtré. Les deux singes Saimiri ont été saignés deux fois par semaine pour effectuer des examens biochimiques et sérologiques et leurs fèces ont été examinées quotidiennement. Les deux singes Saimiri sont morts au jour 28, sans avoir présenté de symptômes particuliers. Aucun des singes n'avait présenté de preuve biochimique convaincante d'un dysfonctionnement hépatique et l'examen histologique effectué post-mortem a montré une congestion du foie sans lésion du parenchyme. Les sérums de ces cinq singes ont été fractionnés dans du tampon Tris NaCl 0,1M, pH 8, sur du "Sephacryl S 300" et les fractions contenant des IgM et des IgG ont été collectées. Elles ont été utilisées en tant qu'anticorps récepteurs dans un test immunoenzymatique. L'IgM a été choisie pour sa capacité de capture élevée et pour empêcher les réactions faussement positives dues à un facteur rhumatoïde ou analogue au facteur rhumatoïde, qui a été reconnu comme stimulant l'antigène NANB.

En fait, on pourrait également utiliser l'IgG bien que son bruit de fond soit un peu plus élevé que celui de l'IgM et sa spécificité déficiente pour certaines préparations.

Pour révéler la fixation d'antigène de fèces sur l'anticorps en phase solide, des IgG provenant de sérums de convalescents ont été fractionnées par chromatographie sur DEAE-trisacryl, après précipitation par du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Les IgG ont été conjuguées à la  $\beta$ -galactosidase ou à la peroxydase. Des IgG marquées ont été utilisées pour la détection de l'antigène : une préparation d'IgG provenant d'un patient ivoirien convalescent d'une hépatite NANB épidémique; une préparation d'IgG prélevée chez un patient algérien guéri, au cours de l'épidémie de Medea en 1981-1982; enfin l'IgG d'un singe Cercopithèque inoculé expérimentalement. Les préparations d'IgG des trois origines ont donné des résultats équivalents. Pour chaque singe, on a utilisé de l'IgM de pré-ino-

- 18 -

5 culation en phase solide comme témoin de spécificité d'IgM de post-inoculation. De l'IgG humaine marquée non-immune a été utilisée comme témoin de marquage d'Ag. Les fèces de singes inoculés ont été examinées pour établir la présence d'un Ag  
10 présumé NANB dans le test ELISA. Une activité antigénique a été détectée dans les fèces des deux singes Saimiri (cf. Tableau 1). L'application d'un traitement par ultra-sons a permis d'augmenter la quantité d'antigène détecté et a augmenté la sensibilité de la méthode. L'Ag est apparu dès le  
15 quatrième jour après l'inoculation et a persisté jusqu'au treizième jour.

Le Tableau 1 montre l'Ag NANB détecté dans les fèces de singes infectés expérimentalement par des extraits de fèces provenant de patients atteints de NANBH épidémique.

15 La détection a été réalisée comme suit, en mettant en oeuvre la technique ELISA : des immunoplaques NUNC ont été revêtues de 100 µl de 50 µg/ml de fraction d'IgM, échantillonnées 27 jours après inoculation, dans une solution physiologique de tampon phosphate (PBS) pendant une heure à 37°C et  
20 une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, les plaques ont été recouvertes de 200 µl de PBS contenant 1% de sérum-albumine bovine et 0,1% de Tween 20, pendant trois heures à 37°C. Après lavage, 100 µl des extraits de fèces (1/10 V/V) filtrés sur un élément de porosité 0,22 µm sont incubés sur les IgM  
25 du revêtement, à 37°C pendant une heure, puis une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, 100 µl d'IgG de singe immun marquée à la peroxydase à 5 mcg/ml dans 1 % de BSA + 0,1 % de Tween 20 dans du tampon Tris sodique, pH 7,6 (TNB) contenant 0,1 % de NaN<sub>3</sub>, ont été utilisés pour la détection de l'Ag. Au bout  
30 d'une heure d'incubation à 37°C et plusieurs lavages, la réaction a été développée à l'aide de 100 µl d'orthophénylène-diamine dans 0,005 M de tampon citrique pH 5,6, avec 1 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les résultats obtenus sont exprimés par le rapport entre l'échantillon étudié et la moyenne de cinq  
35 échantillons négatifs (P/N). Le bruit de fond des échantil-

- 19 -

lons négatifs a été de l'ordre de 0,04-0,06 en densité optique (DO) à 492 nm. Il est plus élevé si le  $\text{NaN}_3$  a été omis, mais, dans ce cas, des quantités de réactifs plus faibles doivent être mises en réaction. Les échantillons dont le rapport P/N 2,1, ont été considérés comme positifs. Les fèces (1/10 poids/poids) qui ont été examinées étaient de deux types : celles ayant subi un traitement aux ultra-sons et celles n'ayant pas subi un tel traitement; le traitement aux ultra-sons appliqué est de trois minutes à 4°C, avec une intensité de sortie de 4 avec l'appareil de BRENSON pour des volumes de 2 à 3 ml avant centrifugation et filtration à travers un élément de porosité de 0,22  $\mu\text{m}$ . Les résultats positifs sont soulignés dans le Tableau 1. Les fèces d'un singe Saimiri ayant reçu de l'extrait de fèces d'un patient atteint d'une maladie du foie non-infectieuse ont servi de témoin et ont constamment donné des résultats négatifs.

TABLEAU 1

20	Nombre de jours après inoculation	P/N sans traitement par ultra-sons		P/N avec traitement par ultra-sons	
		Singe N° 1 (inoculation par voie intraveineuse)	Singe N° 2 (inoculation par voie orale)	Singe N° 1	Singe N° 2
25	0	1,15	1,14	1,18	1,07
	4	<u>2,47</u>	1,60	<u>5,10</u>	0,79
	7	<u>6,48</u>	<u>3,28</u>	<u>8,78</u>	<u>5,52</u>
	9	3,64	<u>2,24</u>	<u>4,72</u>	<u>5,82</u>
	11	1,12	1,40	1,95	5,20
30	13	1,30	1,46	<u>2,40</u>	0,80
	15	1,51	1,68	0,93	0,90
	19	1,53	1,51	1,20	0,80



- 20 -

Une deuxième étape a consisté à étudier des fèces de patients atteints d'une hépatite NANB aigüe présumée, aussi bien sous sa forme épidémique (patients ivoiriens) que sous sa forme sporadique (patients français). Le diagnostic de l'hépatite NANB a été établi conformément aux critères immunologiques classiques des trois types d'infections par des virus d'hépatite (A, B, delta) : présence ou absence d'IgM et d'IgG anti-HAV pour l'infection par le virus A; HBsAg, anti-HBc et IgM anti-HBc, anti-HBs, pour l'infection par HBV; les Ag delta et anti-delta pour l'infection par HDV, le cas échéant. Pour les patients ivoiriens, les marqueurs de la fièvre jaune ont été recherchés. On a également recherché chez tous ces patients l'infection par le cytomégalovirus par immunocapture d'anticorps IgM et l'infection par le virus d'Epstein-Barr, par détection d'IgM anti-VCA dans les taches immunofluorescentes. L'Ag associé à la NANB a été détecté aussi bien dans les cas épidémiques que dans les cas sporadiques (cf. Tableau 2). Il n'a pas été détecté d'Ag dans 90 extraits témoins de patients européens présentant d'autres troubles gastro-intestinaux. Dans la plupart des cas, ces résultats ont été confirmés plusieurs fois avec différentes IgM ou IgG en phase solide et avec différentes IgG marquées. Les mêmes échantillons positifs ont été étudiés avec l'IgM pré-immune recouvrant une plaque et il n'a pas été détecté d'antigène. Il en résulte que l'Ag détecté paraît étroitement lié au virus NANB.

Le Tableau 2 ci-après illustre la détection d'Ag NANB dans les fèces de patients atteints d'hépatite NANB épidémique (de Côte d'Ivoire) et sporadique (de France). 90 fèces de patients suspectés d'infections gastro-intestinales ont été utilisées comme témoins. Tous les échantillons présumés NANB et 17 des 90 témoins ont été soumis à un traitement par ultra-sons. De l'anticorps (Ac) humain marqué à la peroxydase ou la  $\beta$ -galactosidase, a été utilisé comme traceur d'Ag.



- 21 -

TABLEAU 2

5		Echantillons de fèces de Côte d'Ivoire : cas épidémiques	Echantillons de fèces de France : cas sporadiques	Témoins de France
	AG NANB positif	17	7	0
10	AG NANB négatif	44	10	90

Pour vérifier que l'Ag détecté est effectivement étroitement lié au virus NANB, au cours d'une troisième étape, des lignées cellulaires continues d'origine hépatocy-  
 15 cytiques, PLC/PRF 5 et HEP G2, et des cellules normales humaines fibroblastiques MRC 5, ont été inoculées dans du milieu de DULBECCO contenant 10% de sérum de veau foetal, par un extrait de fèces d'un malade atteint d'hépatite NANB. Après confluence de la culture, une sous-culture a été réali-  
 20 sée après addition d'EDTA-trypsine. Dans certains cas, des substances toxiques présentes dans les fèces provoquent la mort des cellules précocement lors de la première semaine, tandis que d'autres fèces non toxiques pour les lignées cel-  
 lulaires, induisent la mort des cellules après plusieurs pas-  
 25 sages. Cet effet léthal spécifique a été observé uniquement avec la lignée cellulaire PLC/PRF 5 mais ne l'a pas été avec la lignée cellulaire HEP G2 et les cellules MRC 5. Après traitement des cellules aux ultra-sons et filtration sur porosité 0,22 µm, de l'Ag NANB a été détecté dans le surna-  
 30 geant de PLC/PRF 5 infectées mais pas dans le surnageant des HEP G2 infectées dans les mêmes conditions.

Pour des extraits de foie de singes inoculés, on n'a pas observé de toxicité cellulaire après inoculation et les cellules PLC/PRF 5 ont présenté une positivité anti-  
 35 génique de la même manière que dans le cas d'échan-

- 22 -

tillons de fèces (cf. Tableau 3).

Le Tableau 3 illustre la détection d'Ag NANB dans la lignée cellulaire d'hépatome inoculée par un extrait de fèces d'un patient ivoirien souffrant d'hépatite NANB épidémique et par un extrait de foie d'un singe Saimiri infecté (N° 1).

L'extrait de foie a été préparé dans du PBS (10% poids/poids) et homogénéisé à l'aide de l'"Ultraturax". Après centrifugation, le culot a été remis en suspension dans 4 fois son volume de TNB et soumis à un traitement aux ultrasons en présence de 0,005 mg/ml de chlorure de phénylméthylsulfonide (PMSF).

Un extrait de foie d'un singe Saimiri inoculé par un extrait de fèces de patients souffrant d'une maladie de foie non-infectieuse a servi de témoin.

Après trois passages, les cultures cellulaires inoculées ont été centrifugées. Le culot a été repris dans du TNB et après addition de PMSF, les cellules ont été soumises à un traitement aux ultra-sons. Les chiffres indiquent le rapport P/N.

TABLEAU 3

Lignée cellulaire d'hépatome	Cellules inoculées par de l'extrait de fèces de patient ivoirien	Cellules inoculées par de l'extrait de foie de singe Saimiri infecté	Cellules inoculées par de l'extrait de foie de singe Saimiri témoin	Cellules non-inoculées
PLC/PRF 5	8,19 *	4,39	2	1,01
HEP G2	1,62	1,14	2	1,07

\* après dilution à 1/100 P/N : 6,29.

- 23 -

Il semble ressortir des essais préliminaires de marquage par immunofluorescence qu'une cellule sur 50 environ, seulement, soit infectée, dans les conditions expérimentales.

5 Une quatrième étape a eu pour objet de purifier l'antigène associé au virus, provenant d'échantillons de fèces de différentes origines. Trois profils de répartition d'antigène ont été observés et sont représentés à la figure 1 annexée qui montre que dans des échantillons  
10 fraîchement utilisés, l'activité antigénique apparaît sous la forme d'une bande à une densité de 1,29-1,32 g/cm<sup>3</sup>. Certains des échantillons de fèces conservés à + 4°C pendant quelques mois, ou des échantillons frais ayant subi un traitement par ultra-sons, n'ont présenté d'activité  
15 antigénique qu'à une densité de 1,12-1,19 g/cm<sup>3</sup>, tandis que d'autres présentaient une activité aux deux densités.

La figure 1 représente la répartition de l'antigène dans le gradient de CsCl après ultracentrifugation isopycnique, obtenue en procédant comme suit :

20 3 ml d'échantillons de fèces (10 % dans RPMI) ont été fractionnés après filtration à travers un élément filtrant de 0,22 µm de porosité, dans un gradient de CsCl de densité comprise entre 1,1 et 1,6 g/ml. La centrifugation isopycnique (48 heures) à 78000 g a été effectuée  
25 dans des tubes de 12 ml (1,2,3,2, 0,5, 0,5 ml de CsCl de densité 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 et 1,6 respectivement). 0,6 ml de fractions ont été collectés et testés pour déterminer la présence d'antigène NANB après deux dilutions.

Dans la figure 1 :

30 A désigne les fèces fraîches

B et C des fèces conservées ou traitées aux ultra-sons.

Du matériel antigénique à faible densité apparaissant dans ces conditions est supposé résulter d'un  
35 effet de décomposition par des enzymes contenues dans

- 24 -

les fèces ou par un traitement physique. Les fractions de CsCl à antigénicité positive ont été soumises à une ultracentrifugation dans un gradient de saccharose variant de 10 à 60 % poids/volume et les fractions réactives ont été étudiées à l'ultramicroscope. L'antigène NANB a été trouvé à 40-41,5 % de saccharose et de façon prédominante à 26-28 % de saccharose. Sept préparations obtenues à partir de 9 échantillons à antigénicité NANB positive, comportaient des particules virales : une provenant d'un singe Saimiri inoculé (le second singe n'a pas été examiné), deux provenant de deux des trois patients atteints d'hépatite NANB épidémique aiguë (Côte d'Ivoire), quatre provenant de quatre des cinq patients atteints d'hépatite NANB sporadique (France). Deux types de particules virales sphériques ont été observées : des particules de grandes dimensions, de l'ordre de 75 nm de diamètre, qui présentent une structure à double membrane, et des particules de dimensions plus petites, homogènes, de 25 à 30 nm de diamètre environ, sans aucune structure interne définie. Une structure tubulaire de 15 nm de diamètre (ou de largeur) et dont la longueur peut atteindre 1 µm, plus ou moins fixée aux particules, a été observée et est représentée à la figure 2 annexée. Certaines images donnent l'impression que des tubules partent de l'enveloppe des particules virales de grandes dimensions. Les particules les plus caractéristiques ont été observées dans des échantillons frais n'ayant pas subi de traitement par ultra-sons. Des particules sphériques de grandes dimensions ont pu être observées pour la plupart dans des fractions de densité comprise entre 1,29 et 1,32 g/cm<sup>3</sup> et dans la fraction de 40-41,5 % de saccharose du gradient de saccharose, tandis qu'on n'a pu observer que des particules de dimensions moindres dans les fractions de CsCl présentant une densité comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup> et dans la fraction du gradient de saccharose à 26-28 % de

- 25 -

saccharose. Il n'a pas encore pu être établi si les particules les plus petites et de densité plus basse représentent une forme de libération du virus de départ. Six échantillons de fèces à antigénicité négative ont également été étudiés simultanément de la même manière pour servir de témoins. On n'a trouvé dans aucune de ces préparations une structure ayant l'aspect de particules.

Une dernière étape a permis de mettre en évidence que la détection d'Ag NANB dans les fèces démontre que le virus NANB épidémique est fréquemment impliqué dans l'hépatite NANB sporadique. De l'Ag NANB associé au virus a été détecté dans sept échantillons de fèces parmi 17 patients examinés atteints d'hépatite NANB sporadique aiguë (cf. figure 2). Des examens sérologiques ont confirmé ces résultats : parmi huit patients dont on disposait des sérums, sept d'entre eux présentaient un sérum avec l'anticorps anti-NANB.

La figure 2 illustre la caractérisation de particules virales au microscope électronique dans les fèces de singes infectés par NANB et de patients atteints d'hépatite NANB.

Après ultracentrifugation isopycnique comme décrit en relation avec la figure 1, les fractions positives ont été mélangées, puis dialysées contre du TNB, puis elles ont été soumises à une ultracentrifugation zonale dans un gradient de saccharose (10-60 % poids/poids) à 78000 g pendant 5 heures. Les fractions positives ont été mélangées, dialysées, concentrées et examinées au microscope électronique. Une goutte de préparation virale a été étalée sur une grille de 200 mesh revêtue de carbone et après absorption sur papier-filtre, une goutte de 2 % d'acétate d'uranyle dans de l'eau distillée a été ajoutée. Au bout de deux minutes, la grille a été essuyée avec du papier-filtre et étudiée au microscope JEM 100 C x II.

- 26 -

Les figures 3 et 4 annexées représentent des coupes vues au microscope électronique après coloration par l'acétate d'uranyle de cellules PLC/PRF 5 inoculées avec un extrait de selles d'un patient souffrant d'hépatite non A non B chez lequel l'Ag a été détecté dans ses selles selon les techniques décrites plus haut.

Les particules virales sont retrouvées dans le noyau et le cytoplasme sous forme de "réseaux cristallins" ; le diamètre de la particule est très constant : 74 à 75 nm. La figure 3 est une vue à grossissement X16000 et la figure 4 une vue à grossissement 54000.

Comme les épidémies d'hépatite NANB sont habituellement observées dans les pays en voie de développement, il a paru intéressant d'examiner si les mêmes virus jouent, dans ces pays, un rôle dans les cas sporadiques. C'est pourquoi 28 sérums de patients marocains souffrant d'hépatite NANB aiguë sporadique ont été examinés pour déterminer s'ils contiennent des anticorps vis-à-vis du virus NANB épidémique. 68 % des patients se sont avérés présenter des anticorps anti-virus NANB épidémique tandis que les mêmes anticorps n'ont été détectés que dans 10 % de sérums de donneurs de sang, dans le même pays.

Le Tableau 4 ci-après illustre la détection d'anticorps spécifiques vis-à-vis de l'antigène NANB dans des sérums de patients souffrant d'hépatite NANB sporadique. La présence d'anticorps a été démontrée par inhibition de la réaction dans les conditions décrites dans le Tableau 1 ci-dessus. La réaction a été réalisée en incubant 50 µl d'un extrait de référence provenant de fèces de singe infecté, pendant une heure à 37°C et une nuit à 4°C, avec 50 µl du sérum à examiner. Toutes les autres étapes de la réaction ont été réalisées de la même manière que pour la détection de l'Ag. Le rapport P/N de cet antigène de référence était de l'ordre de 6-8. 24 sérums humains normaux non dilués ont été testés dans une réaction d'inhibition contre l'Ag de référence comparativement au PBS ;

- 27 -

aucun d'entre eux n'a exercé d'action inhibitrice. Ultérieurement, 50 µl d'un mélange de ces sérums ont servi à établir la positivité à 100 % de la réaction. Les échantillons testés ont été considérés comme positifs lorsque l'inhibition était supérieure à 50 %.

\* L'Ag NANB a été détecté dans les fèces de cinq patients souffrant d'hépatite NANB aiguë ; on n'a pas trouvé d'anticorps dans l'une d'entre elles. Chez deux autres patients, la maladie aiguë datait respectivement de 9 et de 3 mois et il n'a plus pu être détecté d'Ag dans les fèces. Le dernier des cinq patients avait présenté dans le passé une hépatite NANB avec de l'anticorps décelable qui a disparu au bout de 3 ans.

TABLEAU 4

Source de sérum Pays	Donneurs de sang	Personnel du Labo- ratoire	Patients en hémodyalyse	Hépatite NANB sporadique
MAROC	8/78	0/12	1/12	19/28
FRANCE	0/26			7/8

Comme le montre le Tableau 4 ci-dessus, l'hémodyalyse ou un travail de laboratoire impliquant la manipulation de sang humain ne paraît pas augmenter le risque d'infection par le virus NANB. Le fait que l'on utilise des Ac préparés à partir de singes infectés par un virus NANB épidémique, pour la détection d'Ag liés à un virus NANB sporadique, montre qu'il s'agit du même virus.

Les différentes étapes de l'étude qui viennent d'être décrites ont permis de caractériser un nouvel agent viral impliqué dans l'hépatite NANB. Cet agent viral semble être responsable aussi bien de la forme épidémique que de la forme sporadique et de la forme post-transfusionnelle de l'hépatite NANB.



- 28 -

Il est différent du virus HAV :

- 1) Une infection par le virus NANB épidémique a été observée chez un singe et chez des patients présentant une immunité anti-HAV ;
- 2) Les marqueurs usuels de l'infection aiguë (IgM anti-HAV) n'ont pas été détectés ;
- 3) Ce virus induit une réponse immune spécifique et les anticorps n'ont pas réagi avec une préparation virale de HAV ; des sérums de patients convalescents d'hépatite A ont donné des résultats négatifs dans le test de détection d'anticorps anti-virus NANB épidémique.

Le virus NANB épidémique est également distinct du HBV et par voie de conséquence du HDV :

- 1) La maladie a évolué chez certains patients présentant des anticorps anti-HBsAg et est également apparue chez un patient européen vacciné présentant une forte immunité anti-HBV ;
- 2) Il n'a généralement pas été détecté de HBsAg et HBeAg ; s'il préexiste des marqueurs de HBV à l'hépatite NANB (chez certains patients ivoiriens), il n'apparaît pas d'IgM anti-HBc ;
- 3) Des IgM de singes infectés par du virus NANB épidémique et utilisées pour la détection d'antigène viral, ne réagissent ni avec le HBV ou avec des préparations purifiées de HBsAg, ni avec des sérums de patients répliquant activement le HBV ; des anticorps anti-HBs n'interfèrent pas dans le test de détection d'antigène anti-virus NANB épidémique.

Le nouveau virus purifié caractérisé comme décrit dans ce qui précède semble pouvoir être isolé de sources largement réparties. En plus des cas décrits plus haut,

- 29 -

l'antigène associé au virus a également été trouvé chez un patient sénégalais et des anticorps ont été trouvés dans le sérum d'un patient convalescent d'une épidémie ayant sévi en Algérie. L'agent NANB épidémique est considéré  
5 comme étant un virus véhiculé par l'eau. Néanmoins son rôle dans l'hépatite sporadique, en particulier dans un pays bénéficiant de bonnes conditions d'hygiène, n'exclut pas d'autres voies de transmission, et notamment la voie sanguine.

10 Au demeurant, l'implication du virus NANB épidémique dans des cas d'hépatite NANB sporadique ou post-transfusionnelle, devrait entraîner une reconsidération du qualificatif "épidémique".

Il résulte en effet des travaux de l'Inventeur  
15 que le virus identifié conformément à la présente invention, appelé virus de l'hépatite NANB épidémique, sporadique et transfusionnelle (en abrégé : "H-SET") est également responsable de l'apparition d'hépatite de type non A non B chez des malades transfusés.

20 Une étude comparative comprenant des malades polytransfusés sans hépatite infectieuse et des malades atteints d'hépatite A ou B a montré l'absence d'antigène associé au virus dans leurs selles et l'absence de virus cultivables dans les conditions dans lesquelles le virus  
25 "H-SET" se multiplie. La souche "H-SET" I-617 isolée des selles d'un malade souffrant d'hépatite NANB transfusionnelle, a pu être cultivée sur cellules PLC/PRP5 dans les conditions décrites plus haut. Les lésions correspondant notamment à de nombreuses formations syncytiales apparaissent à J6-J7 précédant le décollement des cellules infectées. Un procédé identique de culture est susceptible  
30 d'être utilisé pour un isolement du virus à partir d'un prélèvement sanguin. Les cultures infectées peuvent être utilisées comme source d'antigène non purifié en vue de la  
35 caractérisation à leur surface des molécules d'anticorps provenant d'un sujet ayant contracté l'infection (le com-

- 30 -

plexe virus-anticorps étant révélé à l'aide d'anti-immunoglobulines humaines marquées).

5 La souche Clamart s'est avérée infectante pour deux singes rhésus (inoculation par ingestion (per os) avec 0,5 ml d'un extrait de selle à 10 %) avec apparition de l'antigène dans les selles entre les 20e et 24e jours après l'inoculation et avec augmentation des transaminases entre le 28e et le 32e jours (signe caractéristique d'atteinte hépatique).

10





MICRO-ORGANISMES	
Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page 14 . ligne 27-29 de la description 1	
<b>A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :</b>	
D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt :	
COLLECTION ECACC	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :	
Porton Down, SALISBURY, Wilts (GRANDE-BRETAGNE)	
Date du dépôt :	N° d'ordre :
15 Avril 1987	V87020502
<b>B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES :</b> (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
<b>C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES :</b> (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)	
JAPON DANEMARK AUSTRALIE	
<b>D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT :</b> (à ne remplir que si nécessaire)	
Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau International (spécifier la nature générale des indications p. ex., « No d'ordre du dépôt »)	
<b>E.</b> <input type="checkbox"/> La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)	
- 6 NOV. 1987 F. HOFFELT	
(Fonctionnaire autorisé)	
<input type="checkbox"/> Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international	
(Fonctionnaire autorisé)	

REVENDICATIONS

1°) Nouvel agent viral purifié impliqué dans l'hépatite virale NANB, caractérisé en ce qu'il présente un profil de répartition de son activité antigénique qui comporte  
5 au moins une bande à une densité de  $1,28-1,32 \text{ g/cm}^3$  et/ou au moins une bande à une densité de  $1,12-1,19 \text{ g/cm}^3$ .

2°) Nouvel agent viral purifié selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un agent viral purifié impliqué dans l'hépatite virale épidémique,  
10 sporadique ou post-transfusionnelle.

3°) Agent viral selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est isolé de fèces de patients atteints d'hépatite NANB, par centrifugation et filtration à travers un filtre dont la porosité est de l'ordre  
15 de  $0,22 \mu\text{m}$ .

4°) Agent viral selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir d'hépatocytes ou à partir de lignées cellulaires continues d'hépatocytes, inoculés par de l'extrait de fèces d'un malade  
20 atteint d'hépatite NANB ou par un extrait de foie d'un singe infecté.

5°) Agent viral selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit agent viral auquel est associé un antigène spécifique, se présente sous la forme  
25 de particules virales sphériques de deux types principaux, à savoir des particules de l'ordre de  $75 \text{ nm}$  de diamètre et des particules de l'ordre de  $25$  à  $30 \text{ nm}$  de diamètre, les premières étant majoritairement présentes dans les fractions d'un gradient de chlorure de césium de densité variant entre  $1,1$   
30 et  $1,6 \text{ g/ml}$ , dont la densité est comprise entre  $1,28$  et  $1,32 \text{ g/cm}^3$  et les fractions à  $40-41,5\%$  d'un gradient de saccharose de concentration variant de  $10$  à  $60\%$  poids/volume et les secondes étant majoritairement présentes dans les fractions du gradient de  $\text{CsCl}$  de densité comprise entre  $1,12$  et  
35  $1,19 \text{ g/cm}^3$  et les fractions à  $26-28\%$  dudit gradient de saccharose.



6°) Antigène associé à l'agent viral selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il est obtenu par traitement d'un agent viral isolé de fèces de patients, cultivé sur des hépatocytes infectés, par des agents de dissociation physique ou chimiques.

7°) Antigène selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est obtenu par traitement aux ultra-sons d'un agent viral isolé de lignées cellulaires continues d'hépatocytes infectés.

8°) Antigène selon la revendication 5 ou la revendication 7, caractérisé en ce que son profil de répartition dans un gradient de CsCl se présente sous la forme d'une bande à une densité de 1,12-1,19 g/cm<sup>3</sup> et/ou d'une bande de densité 1,28-1,32, et en ce que l'antigène est présent après ultracentrifugation des fractions de CsCl dans un gradient de saccharose, dans la fraction à 26-28% du gradient de saccharose pour la première bande et dans la fraction à 40-41,5% du gradient de saccharose pour la seconde bande.

9°) Procédé d'isolement d'un agent viral impliqué dans l'hépatite virale NANB, caractérisé en ce que des fèces de patients atteints d'hépatite NANB sont soumises à un traitement de centrifugation, suivi d'un traitement de filtration à travers un élément filtrant dont la porosité est de l'ordre de 0,22 µm, pour extraire ledit agent viral des fèces.

10°) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le traitement de centrifugation est avantageusement constitué par une opération de centrifugation à 5000 - 8000 g.

11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que préalablement aux opérations de centrifugation et de filtration susdites, l'extrait de fèces est soumis à un traitement de dissociation physique, notamment par ultra-sons ou à un traitement de dissociation chimique.

12°) Procédé d'obtention d'un agent viral impliqué dans l'hépatite virale NANB, caractérisé en ce que des hépatocytes ou des lignées cellulaires continues d'hépatocytes, sont inoculés par un extrait de fèces d'un patient  
5 atteint d'hépatite NANB ou par un extrait de foie d'un singe (de préférence Saimiri) inoculé par un extrait de fèces de patients souffrant d'hépatite NANB, et cultivés jusqu'à confluence de la culture, à partir de laquelle est réalisée une sous-culture, qui est centrifugée après plusieurs passages,  
10 pour recueillir l'agent viral recherché.

13°) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre pour l'obtention d'un agent viral impliqué dans l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle.

14°) Procédé selon la revendication 12 ou la revendication 13, caractérisé en ce que le culot de centrifugation est repris par un tampon approprié pour être soumis à un traitement de dissociation physique ou chimique qui libère dans le surnageant, de l'Ag NANB.

15°) Procédé de détection d'antigène NANB présent dans les fèces de patients atteints d'hépatite virale NANB, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un anticorps anti-NANB constitué par des immunoglobulines isolées du sérum de patients convalescents ou de singes préalablement infectés par  
25 le virus de l'hépatite NANB, qui sont incubées avec des extraits de fèces de mammifères présumés atteints d'hépatite virale NANB, pour former un immunocomplexe antigène-anticorps qui est révélé à l'aide d'un test de détection approprié de la présence de l'antigène NANB dans lesdites fèces, tel que  
30 le RIA ou l'ELISA, notamment, pour la réalisation d'un test de détection de la présence de l'antigène NANB.

16°) Procédé de détection selon la revendication 15, caractérisé en ce que des extraits de fèces de patients présumés infectés par le virus NANB, obtenus par centrifugation  
35 et filtration des fèces de ces patients, sont incubés avec

des immunoglobulines provenant d'un mammifère artificiellement infecté par le virus d'hépatite NANB, pour former un immunocomplexe antigène-anticorps qui est révélé par des tests de détection appropriés tels que le RIA ou l'ELISA, notamment.

17°) Procédé de détection selon la revendication 16, caractérisé en ce que des extraits de fèces de mammifères présumés infectés par le virus NANB, obtenus par centrifugation et filtration des fèces de ces mammifères, sont incubés avec un anticorps anti-NANB constitué par des fractions d'IgM isolées de sérums de singes infectés artificiellement par des extraits de fèces de patients humains connus pour être atteints d'hépatite NANB, fixées sur un support solide, puis avec une fraction d'IgG immune anti-virus NANB d'un mammifère de la même espèce ou d'une espèce voisine, marquée avec un marqueur fluorescent, radioactif ou enzymatique.

18°) Procédé de détection selon la revendication 17, caractérisé en ce que ladite fraction d'IgG immune est marquée à la  $\beta$ -galactosidase ou à la peroxydase, la réaction étant développée à l'aide d'un substrat révélateur approprié tel que l'orthonitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside ou l'orthophénylènediamine en tampon acide.

19°) Procédé de détection selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, caractérisé en ce qu'il est appliqué à la détection des anticorps dans le sang de malades ou dans des produits dérivés du sang.

20°) Procédé de détection selon la revendication 19, caractérisé en ce que la détection desdits anticorps a lieu par mise en contact de sérum de malade ou d'un patient convalescent avec la préparation virale purifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou avec une fraction de cette dernière, après centrifugation et isolement de la bande correspondant à une densité de 1,29-1,32, de préférence préalablement fixée sur les parois d'une microplaque, et révéla-

tion du complexe Ag/Ac par une préparation d'anti-immunoglobulines humaines marquées par un marqueur approprié.

21°) Procédé de détection selon la revendication 19, caractérisé en ce que la détection desdits anticorps a lieu par caractérisation d'une activité anticorps dans les IgM d'un patient permettant un diagnostic très précoce de la maladie, en captant les IgM d'un sérum de malade, en les faisant réagir avec la préparation virale purifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou avec une fraction de cette dernière, et en caractérisant l'Ag fixé sur l'IgM du malade à l'aide d'immunoglobulines anti-immunoglobulines humaines ou de fragments de celles-ci, marqués par un marqueur approprié.

22°) Souche d'un agent viral purifié, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, isolé des fèces d'un malade atteint d'hépatite virale NANB sporadique, dite "Souche Clamart", déposée le 30 Octobre 1986 sous le n° I-617 auprès de la COLLECTION NATIONALE DE CULTURE DE MICROORGANISMES.

23°) Souche d'un agent viral purifié, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, isolé des fèces d'un malade atteint d'hépatite virale NANB épidémique, dite "Souche ivoirienne", déposée le 30 Octobre 1986 sous le n° I-616 auprès de la COLLECTION NATIONALE DE CULTURE DE MICROORGANISMES.

24°) Souche d'un agent viral purifié, dite "Souche ivoirienne", selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une culture du virus de l'hépatite NANB provenant des fèces d'un malade atteint d'hépatite virale NANB épidémique, sur des cellules hépatocytes.

25°) Souche d'agent viral selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une culture du virus de l'hépatite non A non B provenant des fèces d'un malade atteint d'hépatite virale NANB épidémique, sur une lignée cellulaire continue d'hépatocytes, en particulier sur la lignée continue d'hépatocytes PLC/PRF 5 connue sous le nom de "lignée d'Alexander".

26°) Réactif immunologique pour la détection de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, par le procédé de détection selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est constitué par des immunoglobulines isolées de sérum de convalescents humains ou de sérum d'animaux préalablement artificiellement infectés par le virus de l'hépatite NANB.

27°) Réactif immunologique selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il est constitué par un anticorps formé d'immunoglobulines préparées à partir de sérums d'animaux artificiellement infectés par ingestion d'extraits de fèces de patients atteints d'hépatite NANB épidémique.

28°) Réactif immunologique selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il est constitué par un anticorps anti-NANB préparé à partir de sérums d'animaux immunisés par le virus NANB ou ses fractions purifiées.

29°) Réactif immunologique selon la revendication 26, 27 ou 28, caractérisé en ce que l'anticorps anti-NANB est fixé sur un support solide.

30°) Réactif immunologique selon la revendication 29, caractérisé en ce que le support solide revêtu d'anticorps anti-NANB est en outre revêtu de protéines.

31°) Procédé d'isolement d'anticorps anti-NANB de sérums d'animaux artificiellement infectés par ingestion d'extraits de fèces de patients atteints d'hépatite NANB épidémique, caractérisé en ce que lesdits sérums sont chromatographiés sur une colonne de dextrane dans du tampon Tris-NaCl 0,1M, pH 8 pour isoler les IgM anti-NANB.

32°) Procédé selon la revendication 31, caractérisé en ce que les sérums d'animaux artificiellement infectés sont des sérums de singes, collectés à partir du 27e jour après l'infection par des extraits de fèces.

33°) Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que les sérums isolés conformément à la revendication 31 sont fixés sur des supports solides, notamment sur des

plaques en PVC, par contact entre les Igm à des concentrations de l'ordre de 10 à 50 µg de protéines par ml de PBS, et lesdits supports pendant 18 à 24 heures à + 4°C environ.

34°) Procédé selon la revendication 33, caractérisé en ce que lesdits supports solides, revêtus d'anticorps anti-NANB sont ensuite revêtus d'une couche de PBS contenant 0,1 % environ de BSA et 0,1 % environ de Tween 20.

35°) Procédé de détection d'anticorps dans le sang de patients ou dans des produits dérivés de sang, caractérisé (a) en ce que l'on met en contact un échantillon de sang ou de produit dérivé de sang, avec un réactif constitué par un agent viral selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, et (b) en ce que l'on identifie la présence d'anticorps de l'hépatite NANB virale dans ledit échantillon de sang ou de produit du sang.

36°) Procédé de diagnostic de l'hépatite virale NANB sporadique, épidémique ou post-transfusionnelle dans des extraits de fèces, caractérisé en ce que l'on incube les plaques revêtues d'anticorps IgM selon la revendication 28 ou la revendication 29, (a) tout d'abord avec des extraits de fèces pendant 1 heure environ à 37°C environ, puis (b) avec des fractions d'IgM ou d'IgG purifiées à partir de sérums de patients convalescents d'hépatite NANB épidémique et marquées par une enzyme, en présence d'un substrat révélateur convenable.

37°) Procédé de diagnostic selon la revendication 36, caractérisé en ce que les fractions d'IgG sont marquées par la bêta-galactosidase et le substrat révélateur convenable est de préférence constitué par l'orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside.

38°) Procédé de diagnostic selon la revendication 36, caractérisé en ce que les fractions d'IgG marquées par une enzyme, sont obtenues à partir de sérums de patients convalescents d'hépatite NANB épidémique.



-41-

39°) Procédé de préparation des IgG mises en oeuvre selon la revendication 36, caractérisé en ce que les fractions d'IgG sont isolées par purification, de sérums de patients convalescents d'hépatite NANB épidémique, par chromatographie sur une colonne de DEAE-Trisacryl, puis elles sont marquées par une enzyme convenable, de préférence la bêta-galactosidase.

40°) Kit, ou ensemble, prêt à l'emploi pour le diagnostic de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il comprend, outre les tampons, solvants et réactifs nécessaires à la mise en oeuvre du procédé de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 15 à 19 et 36 à 38, au moins un réactif de diagnostic constitué par des IgM anti-NANB fixées sur un support solide, au moins un réactif constitué par des IgG marquées par une enzyme conformément à la revendication 37, et au moins un substrat convenable de révélation de la réaction enzymatique.

41°) Kit de diagnostic de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il comprend un extrait marqué de l'agent viral selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, des anti-immunoglobulines humaines, des tampons convenables et des réactifs de visualisation du marquage de l'agent viral.

42°) Agent thérapeutique pour le traitement de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement un anticorps purifié dirigé contre l'agent viral selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

43°) Agent thérapeutique selon la revendication 42, caractérisé en ce qu'il est essentiellement constitué par les IgM selon l'une quelconque des revendications 26 à 30.

44°) Agent thérapeutique selon la revendication 42, caractérisé en ce qu'il est essentiellement constitué par des anticorps monoclonaux produits par un hybridome résultant de

la fusion de cellules de myélome et de cellules spléniques de souris auxquelles ont été inoculées des agents viraux de l'hépatite NANB selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

- 5                    45°) Souche d'un agent viral purifié isolé des fèces d'un malade atteint d'hépatite virale NANB post-transfusionnelle, dite "souche H-SET" déposée le 5 Février 1987 sous le N° 87.02.05.02 auprès de la Collection ECACC (Grande-Bretagne).

10

15

20

25

30

35

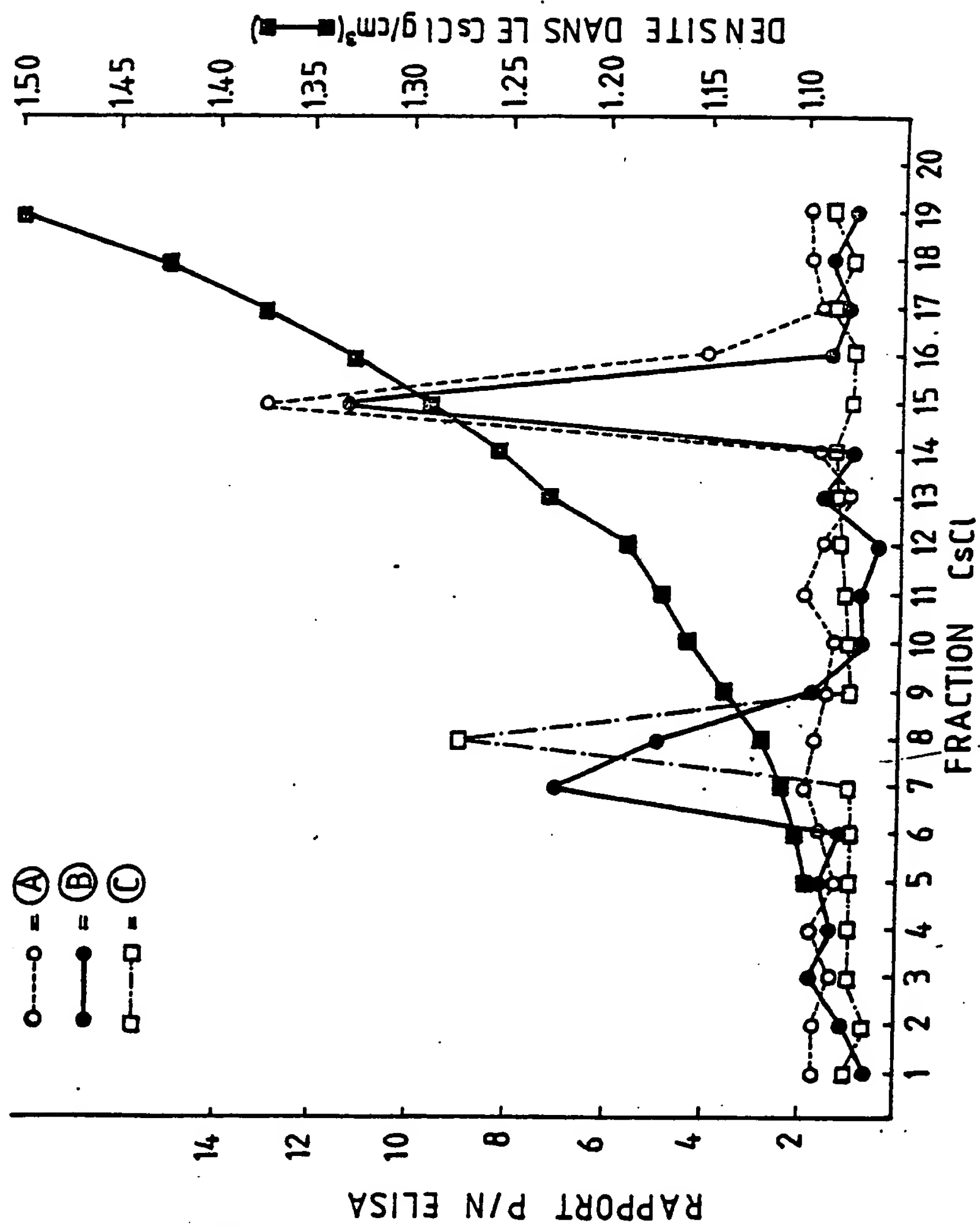


FIG.1

FIG. 2

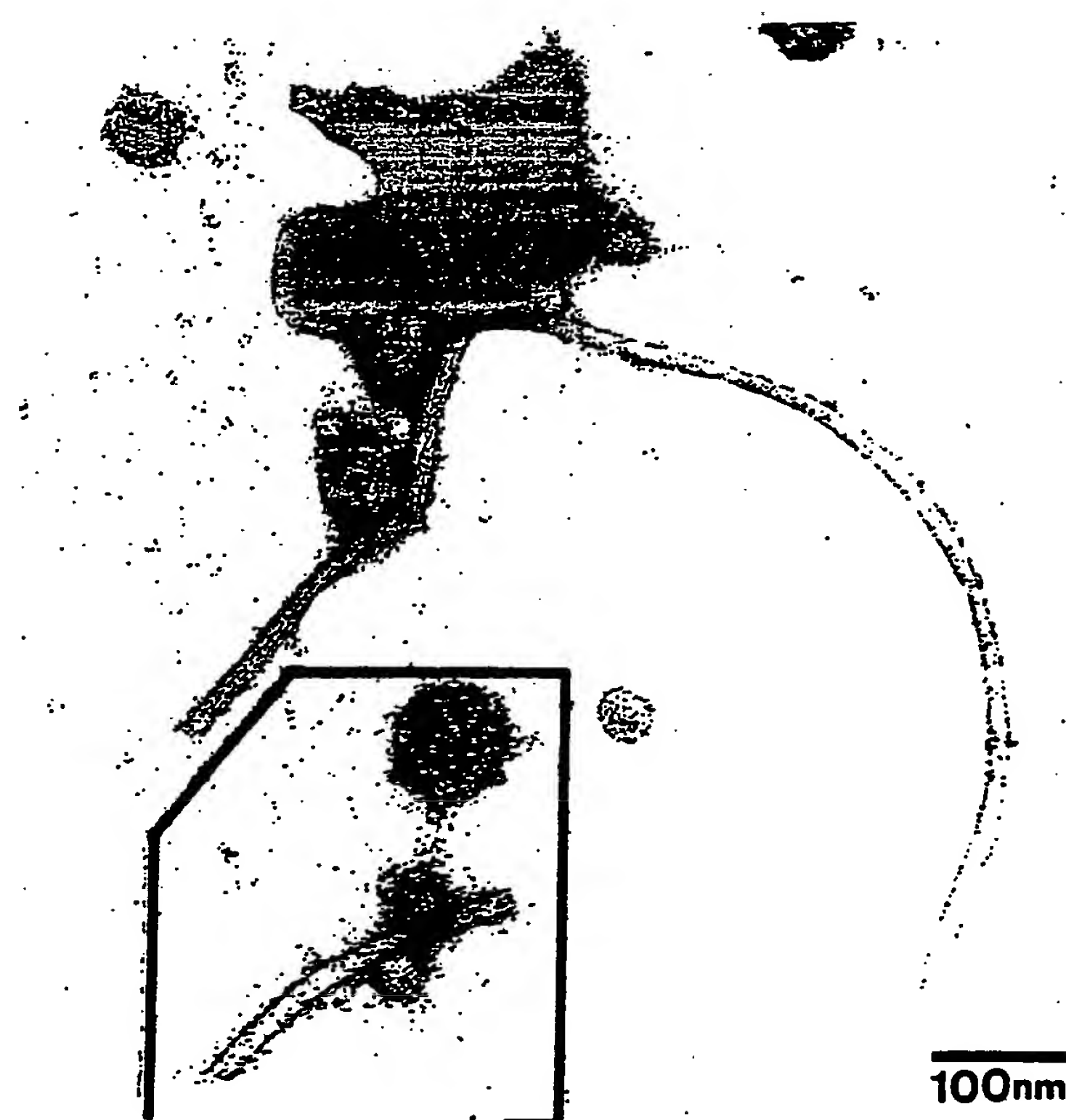
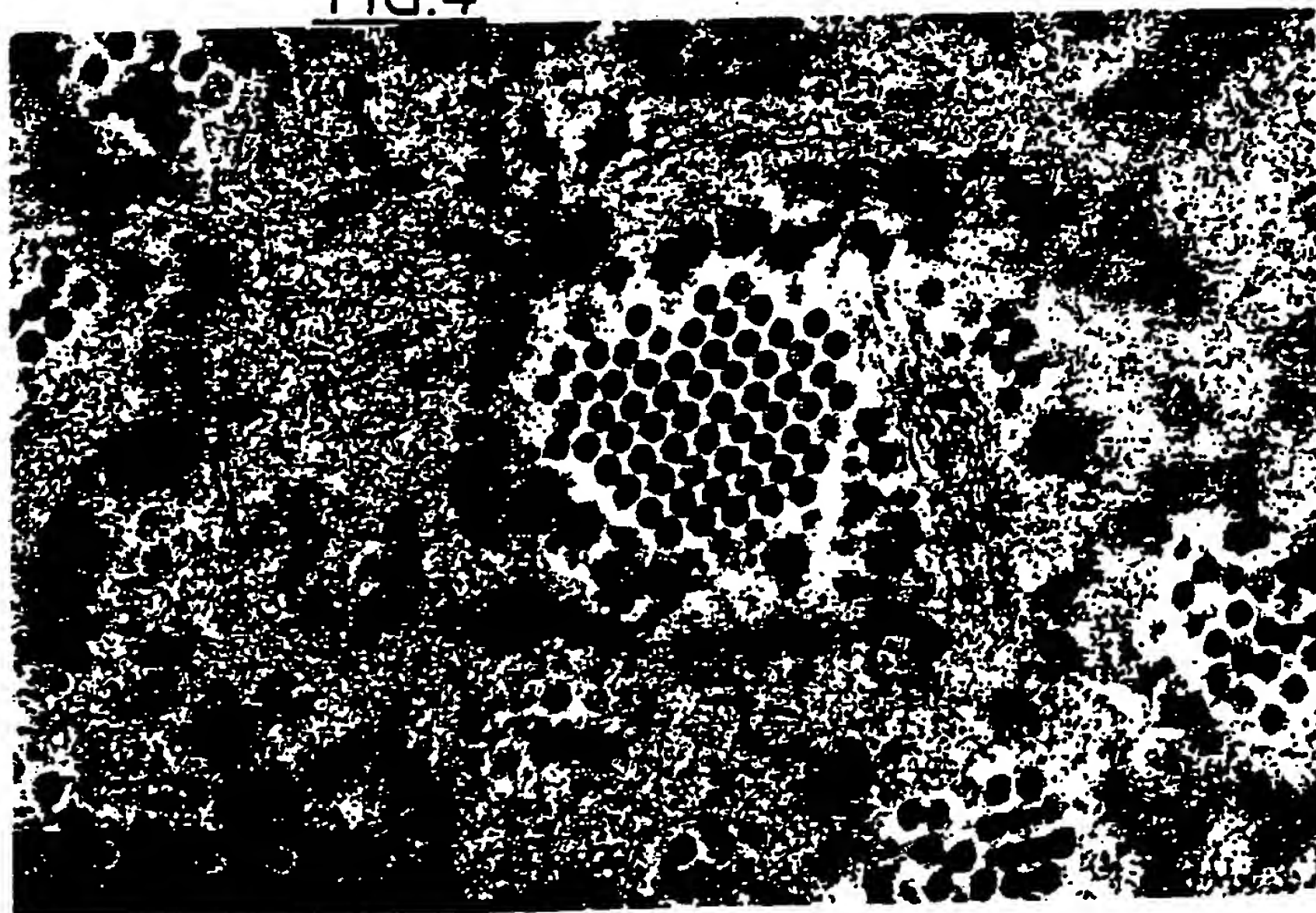


FIG. 3



FIG. 4



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 87/00441

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
CIB <sup>4</sup> : A 61 K 39/29; G 01 N 33/576		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
CIB <sup>4</sup>	A 61 K; G 01 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y,P	EP, A, 0242300 (INSTITUT PASTEUR) 21 October 1987, see page 3, lines 8-44 cited in the application	1-45
Y	Biological Abstracts, volume 82, No. 6, 1986, Biological Abstracts Inc. (Philadelphia, US) J.L. SARTHOU et al.: "Characterization of an antigen-antibody system associated with epidemic non-A, non-B hepatitis in West Africa and experimental transmission of an infectious agent to primates", see page AB-442, abstract 53850, & ANN INST PASTEUR VIROL 137(2): 225-232, 1986	1-45
Y,P	Biological Abstracts, volume 83, No. 12, 1987, Biological Abstracts Inc. (Philadelphia, US), J. Pillot et al.: "Immunological characterization of a viral agent involved in epidemic	1-45
<p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
23 February 1988 (23.02.88)	12 April 1988 (12.04.88)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		



III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	and sporadic non-A, non-B hepatitis", see page AB-576, abstract 119271, & ANN INST PASTEUR VIROL 138(1): 145-158, 1987	
Y	WO, A, 8202774 (BAXTER TRAVENOL LABORATORIES INC.) 19 August 1982, see the whole document	1-45
Y	WO, A, 8002598 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 27 November 1980, see the whole document	1-45
Y	EP, A, 0061974 (TREPO CHRISTIAN) 6 October see the whole document	1-45
A	EP, A, 0093438 (THE BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE) 9 November 1983	
A	EP, A, 0068465 (EISAI CO. LTD) 5 January 1983	
A	EP, A, 0066296 (EISAI CO. LTD) 8 December 1982	
A	WO, A, 8203330 (TREPO CHRISTIAN) 14 October 1982	
-----		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 8700441

SA 19455

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 18/03/88  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0242300	21-10-87	FR-A- 2597606	23-10-87
		JP-A- 62249999	30-10-87
WO-A- 8202774	19-08-82	EP-A, B 0071640	16-02-83
		GB-A, B 2108527	18-05-83
		CA-A- 1168579	05-06-84
WO-A- 8002598	27-11-80	EP-A- 0029063	27-05-81
		US-A- 4356164	26-10-82
		AU-A- 6055380	15-01-81
		CA-A- 1147647	07-06-83
		US-A- 4395395	26-07-83
		CA-A- 1155764	25-10-83
		EP-A- 0128995	27-12-84
		AU-B- 540153	01-11-84
		JP-T- 56501173	20-08-81
EP-A- 0061974	06-10-82	US-A- 4542016	17-09-85
EP-A- 0093438	09-11-83	JP-A- 59042455	09-03-84
		CA-A- 1208554	29-07-86
		US-A- 4702909	27-10-87
EP-A- 0068465	05-01-83	JP-A- 58000753	05-01-83
		CA-A- 1177749	13-11-84
EP-A- 0066296	08-12-82	JP-A- 57198867	06-12-82
		CA-A- 1184846	02-04-85
WO-A- 8203330	14-10-82	FR-A, B 2502154	24-09-82
		EP-A, B 0074986	30-03-83

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 87/00441

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <b>CIB<sup>4</sup>:</b> A 61 K 39/29; G 01 N 33/576		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
<b>CIB<sup>4</sup></b>	A 61 K; G 01 N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie *	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
Y, P	EP, A, 0242300 (INSTITUT PASTEUR) 21 octobre 1987, voir page 3, lignes 8-44 cité dans la demande	1-45
Y	Biological Abstracts, volume 82, no. 6, 1986, Biological Abstracts Inc. (Philadelphia, US) J.L. SARTHOU et al.: "Characterization of an antigen-antibody system associated with epidemic non-A, non-B hepatitis in West Africa and experimental transmission of an infectious agent to primates", voir page AB-442, abrégé 53850, & ANN INST PASTEUR VIROL 137(2): 225-232, 1986	1-45
Y, P	Biological Abstracts, volume 83, no. 12, 1987, Biological Abstracts Inc. (Philadelphia, US), J. Pillot et al.: "Immunological characterization of a viral agent involved in epidemic ./."	1-45
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">23 février 1988</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">12 APR 1988</div>	
Administration chargée de la recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>	Signature du fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">   <b>P.C.G. VAN DER PUTTEN</b> </div>	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
	and sporadic non-A, non-B hepatitis", voir page AB-576, abrégé 119271, & ANN INST PASTEUR VIROL 138(1): 145-158, 1987 --	
Y	WO, A, 8202774 (BAXTER TRAVENOL LABORATORIES INC.) 19 août 1982, voir le document en entier --	1-45
Y	WO, A, 8002598 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 27 novembre 1980, voir le document en entier --	1-45
Y	EP, A, 0061974 (TREPO CHRISTIAN) 6 octobre voir le document en entier --	1-45
A	EP, A, 0093438 (THE BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE) 9 novembre 1983 --	
A	EP, A, 0068465 (EISAI CO. LTD) 5 janvier 1983 --	
A	EP, A, 0066296 (EISAI CO. LTD) 8 décembre 1982 --	
A	WO, A, 8203330 (TREPO CHRISTIAN) 14 octobre 1982 -----	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 8700441  
SA 19455

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 18/03/88  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0242300	21-10-87	FR-A- 2597606 JP-A- 62249999	23-10-87 30-10-87
WO-A- 8202774	19-08-82	EP-A, B 0071640 GB-A, B 2108527 CA-A- 1168579	16-02-83 18-05-83 05-06-84
WO-A- 8002598	27-11-80	EP-A- 0029063 US-A- 4356164 AU-A- 6055380 CA-A- 1147647 US-A- 4395395 CA-A- 1155764 EP-A- 0128995 AU-B- 540153 JP-T- 56501173	27-05-81 26-10-82 15-01-81 07-06-83 26-07-83 25-10-83 27-12-84 01-11-84 20-08-81
EP-A- 0061974	06-10-82	US-A- 4542016	17-09-85
EP-A- 0093438	09-11-83	JP-A- 59042455 CA-A- 1208554 US-A- 4702909	09-03-84 29-07-86 27-10-87
EP-A- 0068465	05-01-83	JP-A- 58000753 CA-A- 1177749	05-01-83 13-11-84
EP-A- 0066296	08-12-82	JP-A- 57198867 CA-A- 1184846	06-12-82 02-04-85
WO-A- 8203330	14-10-82	FR-A, B 2502154 EP-A, B 0074986	24-09-82 30-03-83

EPO FORM P0472